KUNGL PATENT- OCH REGISTRERINGSVERKET
Royal Swedish Patent Office

1979-[redacted]05

MAIL ROOM
JAN
4
1980
3
PAT. & TRADEMARK OFF.

Sökande
Applicant(s)

AB Kabi, Stockholm, SE,

Patentansökningsnr
Patent application nr

7900164-0

RECEIVED
MAR 20 1980

Patentansökningsdatum
Date of patent application

1979-01-08

GROUP 120

Internationell klass
International class

C 08 B 37/10

Uppfinningens benämning
Title of invention

"Heparinfragment med selektiv koagulationsaktivitet".

Härmed intygas att bifogade handlingar är trogna kopior av beskrivning, patentkrav, och sammandrag ~~xxxx ritning(ar)~~ ursprungligen ingivna till patent- och registreringsverket den dag som antecknats på handlingarna.

This is to certify that the annexed documents are true copies of description, claims, and abstract ~~and xxx drawing(s)~~, originally filed with the Swedish Patent Office on the day marked on the documents.

Ex Officio

Lars E. Gärdestad

A-M. Malmsten

A-M. Malmsten

Expeditionsavgift Kr 25:-

PK- 021-7905

Postadress
Box 5055
102 42 STOCKHOLM 5

Gatuadress
Valhallavägen 136

Telefon
08 - 22 55 40

Postgiro
1 56 84 - 4

Bramms. 28/11 79

10:sid

7800184-03

Inl. t. Patentverket
1979 01- 08

AB KABI

Heparinfragment med selektiv koagulationsaktivitet

Föreliggande uppfinning avser heparinfragment, vilka visat sig ha selektiv antikoagulationsverkan, förfarande för framställning därav samt terapeutiska beredningar innehållande sådana fragment.

Heparin är en sulfathaltig polysackarid, som i stor skala isoleras ur tarmslem från svin eller lunga från nötkreatur. Det har i flera årtionden använts kliniskt som medel för behandling och förebyggande av blodpropp. Trots att användningen av heparin i trombosprofylax och -terapi fortfar att öka, är denna behandlingsform långt ifrån problemfri. Ett viktigt problem är att doseringen måste avvägas så att ett gott trombosskydd erhålles samtidigt som blödningskomplikationer undvikes. En svårighet i detta sammanhang är den stora individuella variationen mellan olika patienter; denna beror i sin tur sannolikt på att heparinet i olika hög grad binds till andra komponenter i blodplasman och därigenom neutraliseras. Ett annat problem är att den förebyggande heparinbehandlingen endast är begränsat framgångsrik. Ett tredje problem med nuvarande typ av heparinterapi är dess dåliga effekt vid arteriell trombos. Vid denna trombostyp utgör trombocytaggregationen ett mera dominerande inslag än vid den venösa trombosen, där heparin har god effekt. Standardheparin stimulerar i viss grad trombocytaggregation och har alltså negativ effekt i detta avseende.

Mekanismen bakom heparinets antikoagulationsaktivitet är numera känd till väsentliga delar. Blodkoagulationen är baserad på en kaskadliknande process, där ett antal proteolytiska enzymer aktiverar varandra i en bestämd ordningsföljd, i det sista steget omvandlas fibrinogen under inverkan av det pro-

Ing. Andersson/bw

teolytiska enzymet trombin till olösligt fibrin, stommen i ett blodkoagel. Heparin bildar ett komplex med ett plasmaprotein, antitrombin, och detta komplex inhiberar flertalet enzymer i koagulationskaskaden.

Det har nyligen visats att heparinfraktioner av olika molekylvikt påverkar koagulationsprocessen på olika sätt [L-O. Andersson et al., Thromb. Res. 9, 575 (1976)]. Detta initierade en studie över möjligheterna att få fram heparinfraktioner med mera selektiv verkan. Genom behandling av standardheparin med salpetersyrlighet i dimetoxietan (glyme) vid låg temperatur och viss bestämd tid har man erhållit ett speciellt fragment av heparin som hade betydligt mer selektiv verkan än standardheparin. Detta heparinderivat har mycket liten effekt på inhibitionen av trombin, medan inhibitionen av aktiverad koagulationsfaktor X kraftigt påskyndas. Koagulationsfaktor X intar en central position i mitten av koagulationskaskaden och inhibitionen av den har av många bedömts som speciellt viktig för att få en effektiv trombosförebyggande effekt [S. Wessler, Thromb. Diath. Haemorrh. 33, 81 (1974)].

Det har vidare helt överraskande visat sig att denna typ av fragment inte neutraliseras av blodkomponenterna i samma utsträckning som standardheparin. Detta medför dels att man får ett effektivare utnyttjande av antikoagulansaktiviteten hos denna typ av fragment jämfört med nuvarande kliniskt använda heparinpreparationer. Vidare blir också doseringen lättare att genomföra, då individvariationen i heparin-neutraliserande effekt blir mindre viktig att ta hänsyn till. En ennan överraskande egenskap hos fragmentet är att dess trombocytaggregationsinducerande aktivitet är mycket lägre än vad heparin normalt har. Detta gör det sannolikt att denna typ av fragment är ett bättre antikoagulansmedel än standardheparin vid förebyggande behandling och behandling av arteriella tromboser. Man kan också förmoda att den minskade inverkan på trombocyterna kan medföra mindre risk för blödningskomplikationer.

Det bör dessutom beaktas att heparinets förmåga att frisätta

enzymet lipoproteinlipas är starkt molekylviktsberoende. Det lågmolekylära heparinfragmentet kan därför förmodas ha ytterligare en värdefull egenskap, nämligen att i mindre grad än standardheparin öka halten fria fettsyror i blodet.

Denna speciella typ av heparinfragment kan framställas på flera olika sätt. En metod är behandling av standardheparin med salpetersyrlighet i dimetoxietan som omnämnts ovan. Då erhålles denna typ av fragment tillsammans med en rad andra icke-aktiva fragment. De aktiva fragmenten kan sedan renas från icke-aktiva fragment, bl.a. genom affinitetskromatografering på matrisbundet antitrombin III [Höök et al., FEBS Lett. 66, 90 (1976); Hopwood et al., FEBS Lett. 69, 51 (1976); L-O. Andersson et al., Thromb. Res. 9, 575 (1976)]. Andra sätt att preparera fragment är: 1) via perjodatoxidering vid lågt pH resp.temperatur; 2) via partiell depolymerisering med heparinas; 3) via partiell depolymerisering av heparin genom förestring av karboxylgrupper, följt av alkalisk beta-eliminering; 4) via partiell depolymerisering av heparin genom partiell N-desulfatering följt av deaminering med salpetersyrlighet vid pH 3,9. Metoderna 1) och 2) är beskrivna i exemplen.

De aktiva fragmenten karakteriseras av att de innehåller 14 till 18 sockerenheter. Strukturanalys visar samma huvudstrukturkomponenter som i standardheparin, dvs. L-iduronosyl-2-O-sulfat (1α-4)-N-sulfo-D-glukosamin-6-O-sulfat som dominerande disackaridenhet. Mängden icke-sulfaterad iduronsyra är dock betydligt högre än i utgångsmaterialet. Genom perjodatoxidering har det visats att denna komponent intar en bestämd position i molekylen, belägen 3 till 5 sockerenheter från den icke-reducerande terminalen räknat. De aktiva fragmenten har strukturen $(U\text{-}G)_n\text{-}I\text{-}G\text{-}(U\text{-}G)_m$, där n = 1 eller 2 och m = 5 eller 6; I = icke-sulfaterad L-iduronsyra, U = L-iduronsyra-2-O-sulfat och G = N-sulfo-D-glukosamin-6-O-sulfat. Enstaka U-enheter kan sakna O-sulfat eller vara ersatta med D-glukuronsyra, liksom enstaka G-enheter kan sakna O-sulfat eller vara ersatta med N-acetyl-D-glukosaminenheter. Reducerande och icke-redu-

cerande terminalenheter kan variera med typ av preparationsmetod; efter deaminativ spjälkning av heparin uppstår t.ex. fragment med 2,5-anhydro-D-mannos i reducerande terminal position. De aktiva fragmenten kan karakteriseras med fysikalisk-kemisk metodik omfattande t.ex. bestämning av mobilitet i elektriskt fält, UV-, IR- och NMR-spektra. De erhållna siffervärdena ger dock inte någon komplett information, eftersom även koagulationsmässigt inaktiva fragment visar i huvudsak likartade karakteristika. Detta beror på att den biologiska aktiviteten betingas av en specifik ordningsföljd av socker-resterna, där positionen av den icke-sulfaterade uronsyran är speciellt viktig. Enbart en viss bruttosammansättning och storlek garanterar alltså inte att komponenten har aktivitet.

Uppfinningen åskådliggöres närmare medelst följande exempel.

Exempel 1.

Framställning av heparinfragment genom depolymerisering av standardheparin med salpetersyrlighet

Heparin (0,5 g), isolerat från svintarm, löst i 150 ml vatten, kyles till +4°C och föres genom en 3 x 7 cm pelare av Dowex® 50 W-X8 ($H^+$-form), 200-400 mesh. Pelaren tvättas därefter med 100 ml vatten, varefter tvättvätskan kombineras med provet. Till provet sättes 250 ml dimetoxietan (glyme), kyld till -20°C samt 10 ml isoamylnitrit, och blandningen, som har en temperatur av ungefär +10°C, får stå i två minuter. Reaktionen avbrytes därefter genom tillsats av 10 ml 10 % $Na^+$-acetat. Efter tillsats av 5,2 liter etanol tillvaratages precipiterat kolhydrat (heparinderivat) genom centrifugering. Produkten löses i 500 ml 0,05M NaCl - 0,05M Tris-HCl, pH 7,4. Denna lösning fraktioneras, uppdelad i 100 ml-portioner, genom affinitetskromatografering på en pelare innehållande 75 ml anti-trombin-agaros-Sepharose® (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala) (ungefär 5 mg protein mer ml gel). Pelaren elueras med en saltgradient (500 ml 0,05M NaCl - 0,05M Tris-HCl i blandningskärlet; 500 ml 3M NaCl - 0,05M Tris-HCl i reservoaren), varvid merparten av det appliçerade materialet antingen passerar oretarderad genom pelaren eller elueras vid låg jonstryka

(< 0,4M NaCl); detta material saknar biologisk aktivitet. De aktiva komponenterna (renat heparinderivat) elueras i en bred topp mellan 0,5M NaCl och 3M NaCl motsvarande cirka 4 % av utgångsmaterialet. Dessa fraktioner poolas, koncentreras och avsaltas genom gelkromatografering.

På detta sätt framställt och renat heparinderivat har en molekylstorlek motsvarande en tetradeka-oktadekasackarid (molvikt 3600-4800). Strukturanalys visar samma strukturkomponenter som i utgångsmaterialet, med L-iduronosyl-2-O-sulfat-(1α-4)-N-sulfo-D-glukosamin-6-O-sulfat som dominerande disackaridenhet. Mängden icke-sulfaterad iduronsyra har dock ökat från ungefär 6 % i utgångsmaterialet till ungefär 16 %. Strukturen i övrigt ansluter sig till den ovan angivna beskrivningen.

Exempel 2.

Partiell depolymerisering av heparin eller heparinbiprodukt genom perjodatoxidation vid pH 3 och 4°C, följd av alkalibehandling och reduktion

Under dessa betingelser spjälkas polysackaridkedjan vid D-glukuronsyraenheter, med endast måttlig förlust av antikoagulationsaktivitet (Fransson & Lewis, FEBS Letters, 1979 in press). Standardheparin, 0,5 g, löses i 250 ml av en lösning (4°C) innehållande 0,02M $NaIO_4$, 0,2M $NaClO_4$ och 0,05M $Na^+$-citratbuffert, pH 3,0. Efter 3 timmars inkubation i mörker vid +4°C avbrytes oxidationen genom tillsats av ett molärt överskott D-mannitol, varefter lösningen dialyseras och frystorkas. Spjälkning av polysackaridkedjorna vid oxiderade D-glukuronsyraenheter åstadkommes genom behandling av produkten med alkali (5 mg/ml vattenlösning inställd på pH 12 med 1M NaOH) vid rumstemperatur. Efter 30 minuter neutraliseras lösningen med 1M ättiksyra, varefter materialet avsaltas genom gelkromatografering på dextranmaterial (Sephadex® G-25, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala). Den erhållna produkten kan reduceras med natriumborhydrid.

Heparin som behandlats på detta sätt är avsevärt depolymeriserat jämfört med utgångsmaterialet; gelkromatografering visar

att de resulterande fragmenten har en storlek motsvarande 10-25 sockerenheter, varför de är något större än de fragment som isoleras efter behandling av standardheparin med salpetersyrlighet enligt exempel 1. Totalt förstöres under perjodatoxidationen (pH 3, 4°C, 3-6 timmar) ungefär 20 % av uronsyrorna i polysackariden. Rening genom affinitetskromatografering av oxidationsprodukterna på antitrombin-agaros-Sepharose® gav ungefär 30 % utbyte av högaffinitetsmaterial efter tre timmars och 15 % utbyte efter sex timmars oxidation. De så erhållna produkterna hade en antifaktor $X_a$-potentierande effekt bestämd enligt exempel B i plasma av över 1000 enheter/mg jämfört med 3rd International Heparin Standard.

Studier av antikoagulationsaktivitet

Det i enlighet med exempel 1 framställda heparinfragmentet undersöktes med avseende på sin förmåga att: A) påskynda inhibition av koagulationsenzymet trombin; B) påskynda inhibitionen av aktiverad koagulationsfaktor X; C) förlänga koagulationstiden i blodplasmakoagulationstestet APTT (activated partial thromboplastine time); D) neutraliseras av blodplasmakomponenter; E) påverka aggregation av trombocyter.

Exempel A.

Inhibition av trombin

Heparinfragmentets förmåga att potentiera inhibitionen av trombin med antitrombin III analyserades enligt en modifiering av en metod av Teien et al (Thrombosis Research, 11, p. 107-117, 1977). Heparinfragmentet befanns ha en specifik aktivitet <20 E/mg jämfört med 120-170 E/mg för standardheparin.

Exempel B.

Inhibition av aktiverad Faktor X

Heparinfragmentets förmåga att potentiera inhibitionen av aktiverad Faktor X i plasma och i rent antitrombin III undersöktes enligt en modifierad version av en metod av Teien et al. (Thrombosis Research 8, 413, 1976). Heparinfraktionen

befanns ha en specifik aktivitet av 500 E/mg i ett rent antitrombin III-system och 2100 E/mg i ett plasmasystem jämfört med 120-170 E/mg för standardheparin.

Exempel C.

Förlängning av koagulationstiden

Heparinfragmentets förmåga att förlänga koagulationstiden för blodplasma undersöktes enligt APTT (activated partial thromboplastine time)-metoden [Andersson et al., Thromb. Res. 9, 575 (1976)]. Heparinfragmentet visade en specifik aktivitet < 20 E/mg jämfört med 3rd International Heparin Standard. Standardheparin visar specifik aktivitet i området 120-170 E/mg.

Exempel D.

Neutralisering av heparinfragmentet i blodplasma

Plasmakomponenters heparinneutraliserande effekt undersöktes genom att man uppmätte effekten av heparin och heparinfragmentet i plasma och i ett rent antitrombinsystem. Detta gjordes genom att mäta den mängd aktiverad Faktor X som inhiberades i de båda systemen i närvaro av viss mängd heparin eller heparinfragment. Av heparinfragmentets aktivitet visades 15 % neutraliseras av plasmakomponenter, medan motsvarande värde för standardheparin befanns vara 75 %.

Exempel E.

Trombocytpåverkan

Heparinfragmentets förmåga att aggregera trombocyter vid kritiska ADP (AdenosineDiPhosphate)-koncentrationer undersöktes i huvudsak enligt Beck, E.A. (Thromb Haem Stuttg. 1977, 38, 578). Det visades att heparinfragmentets trombocytaggregerande förmåga var 10 gånger lägre än den för standardheparin, räknat på vikten.

Heparinfragmentet enligt uppfinningen införlivas för klinisk användning i farmaceutiska beredningar, företrädesvis i steril vattenlösning för injektion eller i salvberedning för tillförsel via hud och slemhinnor.

900154-0

1979-01-08

# P A T E N T K R A V

1. Heparinfragment, k ä n n e t e c k n a t av 14 - 18 sockerenheter med disackaridenheten L-idurosyl - 2 - O - sulfat - N - sulfo - D - glukosamin - 6 - 0 - sulfat som huvudkomponent och där icke-sulfaterad L-iduronsyra förekommer i en position belägen 3 - 5 sockerenheter från den icke-reducerande terminalen.

2. Heparinfragment, k ä n n e t e c k n a t av strukturen

$(U-G)_n$ - I - G - $(U-G)_m$, där n = 1 eller 2 och m = 5 eller 6, I = icke-sulfaterad L-iduronsyra, U = L-iduronsyra - 2 - 0 - sulfat, och G = N - sulfo - D - glukosamin - 6 - 0 - sulfat.

3. Heparinfragment med selektiv antikoagulationsaktivitet, k ä n n e t e c k n a t av 14 - 18 sockerenheter med disackarinenheten L - idurosyl - 2 - O - sulfat - N - sulfo - D - glukosamin - 6 - 0 - sulfat som huvudkomponent och där icke-sulfaterad L-iduronsyra förekommer i en position belägen 3 - 5 sockerenheter från den icke-reducerande terminalen.

4. Heparinfragment med selektiv antikoagulationsaktivitet, k ä n n e t e c k n a t av strukturen

$(U-G)_n$ - I - G - $(U-G)_m$, där n = 1 eller 2 och m = 5 eller 6, I = icke-sulfaterad L-iduronsyra, U = L-iduronsyra - 2 - 0 - sulfat och G = N - sulfo - D - glukosamin - 6 - 0 - sulfat.

900184-0

5. Farmaceutiska beredningar, k ä n n e t e c k n a d e av att de innehåller heparinfragment med selektiv antikoagulationsaktivitet med 14 - 18 sockerenheter med disackaridenheten L - idurosyl - 2 - O - sulfat - N - sulfo - D - glukosamin - 6 - O - sulfat som huvudkomponent och där icke-sulfaterad L - iduronsyra förekommer i en position belägen 3 - 5 sockerenheter från den icke-reducerande terminalen.

6. Farmaceutiska beredningar, k ä n n e t e c k n a d e av att de innehåller heparinfragment med strukturen

$(U - G)_n - I - G - (U - G)_m$, där n = 1 eller 2 och m = 5 eller 6, I = icke-sulfaterad L - iduronsyra, U = L - iduronsyra - 2 - O - sulfat och G = N - sulfo - D - glukosamin - 6 - O - sulfat.

7. Förfarande för framställning av heparinfragment enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att man
(a) behandlar heparin med salpetersyrlighet i dimetoxietan och renar det erhållna materialet, eller
(b) perjodatoxiderar heparin vid lågt pH resp. temperatur,
(c) partiellt depolymeriserar heparin med heparinas, eller
(d) partiellt depolymeriserar heparin genom förestring av karboxylgrupper och därefter underkastar det erhållna materialet alkalisk beta-eliminering, eller
(e) partiellt depolymeriserar heparin genom partiell N-desulfatering och därefter deaminerar det erhållna materialet med salpetersyrlighet.

900164-0

Int. f. Patentväsen
1979-01-08

## SAMMANDRAG

Heparinfragment med selektiv antikoagulationsaktivitet, uppvisande 14-18 sockerenheter med disackarinenheten L - idurosyl - 2 - O - sulfat - N - sulfo - D- glukosamin - 6 - - O - sulfat som huvudkomponent och där icke-sulfaterad L-iduronsyra förekommer i en position belägen 3-5 sockerenheter från den icke-reducerande terminalen. Farmaceutiska beredningar innehållande sådana heparinfragment. Förfarande för framställning av heparinfragmenten.